



Łódź, dnia 20 marca 2023r.

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych

mgr. Krzysztofa Tadeusza Krawczyka

pt: „Archeony halofilne jako stymulatory komórek układu odpornościowego człowieka”

wykonanej w

w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ

pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Kowalewicz-Kulbat

Archeony halofilne posiadają zdolność do życia w środowisku o skrajnie wysokim zasoleniu. Jedną z ważnych grup w domenie *Archaea* są archeony halofilne, charakteryzujące się zdolnością do życia w środowisku o skrajnie wysokim zasoleniu. *Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae* to dwa gatunki archeonów halofilnych. Biologiczny wpływ archeonów halofilnych na zdrowie człowieka, ich potencjalne właściwości immunomodulacyjne oraz ochronne, pozostają słabo poznane. Mając na uwadze informacje dostępne w literaturze przedmiotu, mgr Krzysztof Tadeusz Krawczyk postanowił ocenić potencjał immunomodulacyjny archeonów halofilnych, *Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*, wobec ludzkich komórek dendrytycznych (KD) pochodzenia monocytarnego. Łączy IF zawartych w dysertacji publikacji wynosi 17,574, a liczba punktów MEiN 280.

Ocena struktury i zawartości merytorycznej dysertacji

Przedstawiona do oceny rozprawa ma typowy układ i jest niezwykle starannie przygotowanym maszynopisem liczącym 165 stron, uzupełnionym o załączniki: publikacje – jedną poglądową i jedną oryginalną stanowiące podstawę dysertacji oraz oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach. We *Wstępie* Doktorant dokonuje szerokiej charakterystyki archeonów, ze szczególnym uwzględnieniem archeonów halofilnych, oraz opisuje znaczenie komórek dendrytycznych i limfocytów T w odpowiedzi odpornościowej. Tym samym doktorant przygotowuje doskonały grunt pod zrozumienie licznych aspektów merytorycznych ujętych w publikacji przeglądowej załączonej do dysertacji: *Natalia Adamiak, Krzysztof T. Krawczyk, Camille Loch, Magdalena Kowalewicz Kulbat. Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for*

Vaccine Development. Frontiers in Immunology. 2021 Sep 10;12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235. Ponadto uzasadnia w nim przyjęte założenia i cele pracy przedstawione w kolejnym rozdziale. Cele pracy obejmujące wykazanie potencjału immunomodulacyjnego archeonów halofilnych, *Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*, wobec ludzkich komórek dendrytycznych (KD) pochodzenia monocytarnego, są sformułowane w sposób logiczny i spójny zgodnie z założeniem pracy.

W kolejnym rozdziale *Material i metody* Doktorant pieczołowicie opisuje metody badawcze zastosowane w pracy. Należy podkreślić, że do realizacji celów Doktorant zastosował dużą liczbę metod obejmujących: izolację monocytów, limfocytów dziewiczych i pamięci z kożuszków leukocytarno-płytkowych, różnicowanie komórek dendrytycznych z monocytów warunkach *in vitro*, ko-hodowle komórek dendrytycznych i limfocytów T, mikroskopię fluorescencyjną, cytometrię przepływową oraz ELISA. Znajomość szerokiego wachlarza metod świadczy o wszechstronności i swobodzie metodologicznej Doktoranta i jego doskonałym przygotowaniu do realizacji postawionych zadań badawczych. Umiejętność analizy i interpretacji uzyskanych za pomocą tych metod wyników wskazuje na niezwykle dynamiczny rozwój naukowy Doktoranta, jaki nastąpił podczas realizacji badań oraz bogate doświadczenie, które zapewne zapoczątkuje w najbliższej przyszłości.

W rozdziale *Wyniki* Doktorant dokładnie analizuje uzyskane wyniki opisane w publikacji oryginalnej załączonej do dysertacji: Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. *Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Frontiers in Immunology. 2022 May 26;13:833635. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635.* Potwierdza w niej, że archeony halofilne zastosowane w pracy wnikają do komórek dendrytycznych, indukując ich dojrzewanie i produkcję cytokin. Następnie wykazuje, że autologiczne limfocyty T CD4+ pobudzane archeonami halofilnymi prezentowanymi przez KD produkują istotnie intensywniej IFN- γ , IL-12p40, IL-13 oraz TNF- α . W badaniach z użyciem enterotoksyny B *S. aureus* (SEB) wykazano, iż archeony halofilne posiadają właściwości protekcyjne przed genotoksycznym działaniem SEB na KD poprzez ochronę chromatyny przed fragmentacją oraz powstawaniem jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA w KD. Pozostaje to w związku z progresją cyklu komórkowego i ograniczeniem apoptozy. Wyniki zostały zanalizowane za pomocą właściwie dobranych metod statystycznych. Zdaniem Doktoranta wyniki przedstawione w dysertacji sugerują przydatność archeonów halofilnych w opracowywaniu modeli eksperymentalnych

zmierzających do wyjaśnienia roli archeonów halofilnych w haloterapii, jako metody leczenia chorób układu oddechowego.

Dyskusję podsumowującą zawarte w dysertacji wyniki przeprowadził Doktorant zwięźle na 10 stronach maszynopisu w sposób krytyczny, z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa liczącego 132 pozycje. Dyskusja została przeprowadzona w sposób wielowątkowy, jednakże bardzo przejrzysty, co pokazuje duży zasób wiedzy Doktoranta oraz umiejętność właściwego doboru argumentów i danych literaturowych. Wskazuje również na zrozumienie przez Doktoranta złożonych kwestii dotyczących wpływu archeonów halofilnych na biologię komórek dendrytycznych i ich interakcje z limfocytami T.

Uwagi

1. W kilku przypadkach przedstawiono na wykresach wyniki z liczbą niezależnych eksperymentów nie przekraczającą 3. Liczba eksperymentów powinna zostać uzupełniona celem umożliwienia dokonania analizy statystycznej i właściwej interpretacji wyników.
2. W ostatniej części *Dyskusji* Doktorant sugeruje potencjalne zastosowanie haloterapii w leczeniu astmy oskrzelowej u dzieci. Proszę o próbę wyjaśnienia potencjalnego mechanizmu terapeutycznego w odniesieniu do wyników badań uzyskanych w niniejszej dysertacji.
3. Należy podkreślić, iż praca była finansowana z kilku grantów badawczych, w tym Preludium Narodowego Centrum Nauki, której Doktorant był kierownikiem. Na szczególną uwagę zasługuje staż naukowy, który odbył Doktorant w Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF), Davos, Szwajcaria, który zapewne bardzo pozytywnie wpłynął na jego dynamiczny rozwój naukowy.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi rzetelne, wartościowe, oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe aspektów dotyczących wpływu archeonów halofilnych na biologię komórek dendrytycznych i ich interakcje z limfocytami T. Doktorant podjął się ambitnego zadania - prawidłowo zaplanował pracę, uzasadnił podstawę merytoryczną prowadzonych badań, właściwie sformułował i zrealizował cele badawcze, a z uzyskanych wyników wyciągnął szereg interesujących wniosków. Dysertacja jest dobrym przykładem podejścia koncepcyjnego do wybranego problemu naukowego. Istotną wartością rozprawy jest

to, że jest ona jednym z pierwszych opracowań dotyczących obranej do badań tematyki. Praca wnosi bardzo duży wkład w dotychczasową wiedzę w badanym zakresie.

Dlatego uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dn. 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Niniejszym przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Tadeusza Krawczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoką wartość dysertacji, zastosowanie nowoczesnych metod badawczych i wykonanie dogłębnej, krytycznej analizy nakreślonego tematu, jak również unikalny wymiar badań uzyskanych, zwracam się do Komisji o uznanie rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Tadeusza Krawczyka za wyróżniającą.

KIEROWNIK
Kliniki Immunologii i Alergii
Katedry Pulmonologii, Reumatologii
i Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Dr hab. n. med. Maciej Chałubiński, prof. UM